

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OHTA, Akio
Ohta Patent Office
New State Manor 356
23-1, Yoyogi 2-chome
Shibuya-ku
Tokyo 151-0053
JAPON

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 14 March 2001 (14.03.01) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference 1676PCT | |
| International application No. PCT/JP00/03000 | International filing date (day/month/year) 10 May 2000 (10.05.00) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

| | | |
|--|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address 株式会社日本パーカライジング広島工場 NIHON PARKERIZING HIROSHIMA CO., LTD. 34-26,dejima 1-chome Minami-ku Hiroshima-shi, Hiroshima 734-0013 Japan | State of Nationality JP | State of Residence JP |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | Teleprinter No. | |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

| | | |
|--|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address 株式会社日本パーカーライジング広島工場 NIHON PARKERIZING HIROSHIMA CO., LTD. | State of Nationality JP | State of Residence JP |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | Teleprinter No. | |

3. Further observations, if necessary:

No change in the name in English.

4. A copy of this notification has been sent to:

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office | <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority | <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned |
| <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority | <input type="checkbox"/> other: |

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Yukari NAKAMURA Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OHTA, Akio
Ohta Patent Office
New State Manor 356
23-1, Yoyogi 2-chome
Shibuya-ku
Tokyo 151-0053
JAPON

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 11 January 2001 (11.01.01) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference 1676PCT | |
| International application No. PCT/JP00/03000 | International filing date (day/month/year) 10 May 2000 (10.05.00) |

| | | |
|--|--|---|
| 1. The following indications appeared on record concerning: | | |
| <input type="checkbox"/> the applicant | <input type="checkbox"/> the inventor | <input checked="" type="checkbox"/> the agent |
| <input type="checkbox"/> the common representative | | |
| Name and Address OHTA, Akio Toyo Kohan Co., Ltd. 2-12, Yonbancho Chiyoda-ku, Tokyo 102-8447 Japan | State of Nationality | State of Residence |
| | Telephone No. 03-5211-6209 | |
| | Facsimile No. 03-5211-6231 | |
| | Teleprinter No. | |
| 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: | | |
| <input type="checkbox"/> the person | <input type="checkbox"/> the name | <input checked="" type="checkbox"/> the address |
| <input type="checkbox"/> the nationality | | |
| <input type="checkbox"/> the residence | | |
| Name and Address OHTA, Akio Ohta Patent Office New State Manor 356 23-1, Yoyogi 2-chome Shibuya-ku Tokyo 151-0053 Japan | State of Nationality | State of Residence |
| | Telephone No. 03-5334-6055 | |
| | Facsimile No. 03-5334-6056 | |
| | Teleprinter No. | |
| 3. Further observations, if necessary: | | |
| 4. A copy of this notification has been sent to: | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned | |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned | |
| <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority | <input type="checkbox"/> other: | |

| | |
|---|---------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Y. KUWAHARA |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|---------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 1676PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/03000 | 国際出願日 (日.月.年) 10.05.00 | 優先日 (日.月.年) 10.05.99 |
| 出願人(氏名又は名称) 東洋鋼板株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| PX | WO, 99/63072, A1 (東洋鋼板株式会社) 9. 12月. 1999 (09. 12. 99) & A U, 9940596, A | 1-8 |
| PX | WO, 99/41362, A1 (東洋鋼板株式会社) 19. 8月. 1999 (19. 08. 99) & A U, 9921872, A | 1-8 |
| X | Schena, M. et al. "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 第93巻 p. 10614-10619 | 8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 08. 00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4 N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) : 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | EP, 701001, A (株式会社日立製作所) 19. 3月. 1996 (19. 03. 96) & J P, 8-70898, A & CN, 1127887, A | 3-8 |
| | | |

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | | | |
|--|--|---|--|--|
| (51) 国際特許分類7 C12N 15/00, C12Q 1/68, C12M 1/34 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/68368 (43) 国際公開日 2000年11月16日(16.11.00) | | |
| <table border="0"><tr><td data-bbox="97 409 803 1071">(21) 国際出願番号 PCT/JP00/03000 (22) 国際出願日 2000年5月10日(10.05.00) (30) 優先権データ 特願平11/127943 1999年5月10日(10.05.99) <i>10 Nov 21/30ms</i> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋鋼鋳株式会社(TOYO KOHAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 Tokyo, (JP) 株式会社 日本パーカライジング広島工場 (NIHON PARKERIZING HIROSHIMA CO., LTD.)(JP/JP) 〒734-0013 広島県広島市南区出島1丁目34番26号 Hiroshima, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 高橋浩二郎(TAKAHASHI, Kojiro)(JP/JP) 〒734-0015 広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号 Hiroshima, (JP) 高井 修(TAKAI, Osamu)(JP/JP) 〒734-0003 広島県広島市南区宇品東2丁目2番29号 株式会社 日本パーカーライジング 広島工場 テクノセンター内 Hiroshima, (JP)</td><td data-bbox="803 409 1510 1071">(74) 代理人 太田明男(OHTA, Akio) 〒102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 東洋鋼鋳株式会社内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書</td></tr></table> | | | (21) 国際出願番号 PCT/JP00/03000 (22) 国際出願日 2000年5月10日(10.05.00) (30) 優先権データ 特願平11/127943 1999年5月10日(10.05.99) <i>10 Nov 21/30ms</i> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋鋼鋳株式会社(TOYO KOHAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 Tokyo, (JP) 株式会社 日本パーカライジング広島工場 (NIHON PARKERIZING HIROSHIMA CO., LTD.)(JP/JP) 〒734-0013 広島県広島市南区出島1丁目34番26号 Hiroshima, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 高橋浩二郎(TAKAHASHI, Kojiro)(JP/JP) 〒734-0015 広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号 Hiroshima, (JP) 高井 修(TAKAI, Osamu)(JP/JP) 〒734-0003 広島県広島市南区宇品東2丁目2番29号 株式会社 日本パーカーライジング 広島工場 テクノセンター内 Hiroshima, (JP) | (74) 代理人 太田明男(OHTA, Akio) 〒102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 東洋鋼鋳株式会社内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP00/03000 (22) 国際出願日 2000年5月10日(10.05.00) (30) 優先権データ 特願平11/127943 1999年5月10日(10.05.99) <i>10 Nov 21/30ms</i> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋鋼鋳株式会社(TOYO KOHAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 Tokyo, (JP) 株式会社 日本パーカライジング広島工場 (NIHON PARKERIZING HIROSHIMA CO., LTD.)(JP/JP) 〒734-0013 広島県広島市南区出島1丁目34番26号 Hiroshima, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 高橋浩二郎(TAKAHASHI, Kojiro)(JP/JP) 〒734-0015 広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号 Hiroshima, (JP) 高井 修(TAKAI, Osamu)(JP/JP) 〒734-0003 広島県広島市南区宇品東2丁目2番29号 株式会社 日本パーカーライジング 広島工場 テクノセンター内 Hiroshima, (JP) | (74) 代理人 太田明男(OHTA, Akio) 〒102-8447 東京都千代田区四番町2番地12 東洋鋼鋳株式会社内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 | | | |
| (54) Title: ✓ METHODS FOR CONSTRUCTING DNA LIBRARY AND SUPPORT CARRYING DNA LIBRARY IMMOBILIZED THEREON (54) 発明の名称 DNAライブラリーの作製方法、DNAライブラリーを固定化した基体 (57) Abstract A method for constructing a cDNA library which comprises hybridizing mRNA with oligo(dT) _n on a support and treating with a reverse transcriptase so as to immobilize complementary DNA; or a method for constructing a gDNA library which comprises ligating a double-stranded chromosomal DNA library with an oligonucleotide on a support having a restriction enzyme site and then immobilizing the gDNA library; a method for preparing replicas thereof; and a support carrying the thus replicated DNA fragment thereon. | | | | |

本発明は、基体上のオリゴ (d T) _n に m R N A をハイブリダイズさせた後、逆転写酵素を作用させて、相補的な D N A を固定化させる c D N A ライブラリーの作製方法、または、制限酵素部位を有した基体上のオリゴヌクレオチドに、二本鎖の染色体 D N A ライブラリーをライゲーションさせた後、g D N A ライブラリーを固定化させる g D N A ライブラリーの作製方法に関する。さらに、これらの複製を作製する方法、複製した D N A 断片を固定化した基体にも関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AG | アンティグア・バーブーダ | DZ | アルジェリア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LV | ラトヴィア | SN | セネガル |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | MC | モナコ | TD | チャード |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MD | モルドヴァ | TG | トーゴ |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TJ | タジキスタン |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TM | トルクメニスタン |
| BR | ブラジル | GW | ギニア・ビサウ | ML | マリ | TR | トルコ |
| BY | ベラルーシ | HR | クロアチア | MN | モンゴル | TT | トリニダード・トバゴ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MR | モーリタニア | TZ | タンザニア |
| CC | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MW | マラウイ | UA | ウクライナ |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | MX | メキシコ | UG | ウガンダ |
| CH | スイス | IN | インド | MZ | モザンビーク | US | 米国 |
| CI | コートジボアール | IS | アイスランド | NE | ニジェール | UZ | ウズベキスタン |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NL | オランダ | VN | ヴェトナム |
| CN | 中国 | JP | 日本 | NO | ノールウェー | YU | ユーゴスラヴィア |
| CR | コスタ・リカ | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CU | キューバ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | ZW | ジンバブエ |
| CY | キプロス | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| CZ | チェッコ | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |
| DE | ドイツ | | | | | | |
| DK | デンマーク | | | | | | |

明 細 書

DNAライブラリーの作製方法、DNAライブラリーを固定化した基体

5 技術分野

本発明は、遺伝子工学、蛋白質工学、細胞工学、免疫学等の分子生物学や生化学関連分野において、微量のDNA試料を用いて、DNAライブラリー等を基体上に固定化したオリジナル・チップを作製する方法、その複製を作製する方法、DNA断片を固定化した基体に関する。

10

背景技術

従来、DNAを用いてさまざまな実験をする場合は、DNAがきわめて貴重な試料であることから、PCR（ポリミラーゼ チェイン リアクション、Polymerase Chain Reaction）装置などを用いてこれを増幅し、小分けしていた。また、
15 DNA試料の保管は極低温にて冷凍庫を用いていた。また、従来は、DNAライブラリーは溶液状態で作製されており、そのDNAライブラリーの複製（レプリカ）を作製することは不可能であった。従って、微量の組織や細胞から得られる溶液状態のDNAライブラリー試料を用いて行う遺伝子研究や遺伝子診断等はきわめて慎重に行わなければならなかった。本発明は、少量のDNAライブラリー
20 試料を用いて、DNAライブラリーを基体（チップ）上に固定化したDNAライブラリー・チップ（オリジナル・チップ）を作製する方法を提供することを課題とする。また、上記DNAライブラリー・チップを用いて、必要な数の複製（レプリカ）・チップを作製する方法を提供することを課題とする。

また、複製したDNA断片を固定化した基体を提供することを課題とする。

発明の開示

本発明の、cDNAライブラリー作製方法は、基体上のオリゴ(dT)_nにmRNAをハイブリダイズさせた後、逆転写酵素を作用させて、相補的なDNAを固定化させることを特徴とする。

本発明の、cDNAライブラリー作製方法は、基体上に固定化したcDNAライブラリーからmRNAを脱ハイブリダイズさせ、そのmRNAを用いて、前記cDNAライブラリーと同一のcDNAライブラリーを固定化させることを特徴とする。

本発明の、gDNAライブラリー作製方法は、制限酵素部位を有した基体上のオリゴヌクレオチドに、二本鎖の染色体DNAライブラリーをライゲーションさせた後、gDNAライブラリーを固定化させることを特徴とする。

本発明の、一本鎖gDNAライブラリー作製方法は、請求項3で作製した基体上のgDNAライブラリーの固定化センス部分を用いて作製することを特徴とする。

本発明の、一本鎖gDNAライブラリー作製方法は、請求項3で作製したgDNAライブラリーのアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後、そのアンチセンス部分を用いて基体上にセンス部分を合成固定化させることを特徴とする。

本発明の、方法は、請求項1～5のいずれかの方法において、基体が、あらかじめヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが化学修飾されたものであることを特徴とする。

本発明の、基体は、請求項1～6のいずれかの方法によって作製されたDNAライブラリーを固定化したものであることを特徴とする。

本発明の、基体は、一本鎖のDNAライブラリーが固定化されたものであることを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のcDNAライブラリー・チップの作製装置の概略図である。

図 2 は、本発明の g DNAライブラリー・チップの作製装置の概略図である。図 3 は、本発明の c DNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。図 4 は、本発明の c DNAライブラリー・チップの作製手順を示す概略図である。図 5 は、本発明の g DNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。図 6 は、本発明の g DNAライブラリー・チップの作製手順を示す概略図である。図 7 は、チップ f の拡大図である。図 8 は、チップ e の拡大図である。

発明を実施するための最良の形態

10 オリジナル・チップ又はレプリカ・チップを作製するには、ヌクレオチドあるいはオリゴヌクレオチドに対する化学修飾のみを施したオリジナル用チップ一枚と複製用のレプリカ用チップ複数枚とを用意する。そして、それらのチップをレプリカ作製装置に設置する。本発明の DNAライブラリー・チップ作製装置を、図面を用いて説明する。図 1 は、c DNAライブラリー・チップ作製装置の概略
15 図である。図 2 は、g DNAライブラリー・チップ作製装置の概略図である。図 3 は、c DNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。図 5 は、g DNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。

図 1 に、c DNAライブラリー・チップの作製及び複製を自動的に行うことができる装置の概略を示す。図 1 において、DNAライブラリー・チップ作製装置
20 A は、反応液等を容器に送液するための送液手段 105 と、反応液を切り替えて送液するための送液切替手段 220 と、試料注入注出用ノズル 101 を平面内の前後左右方向や上下方向等に駆動させることができるノズル駆動手段 100 と、
チップの入った容器を保持するための容器保持手段 10 と、前記容器中の反応液
25 を加熱冷却する容器液温度制御手段 30 と、固定化 DNAライブラリー・チップの作製のための試料や試薬等の入った容器を保持するための試薬容器保持手段 2

0 と、前記試薬容器保持手段を所定温度に保持するための試薬容器温度制御手段 40、などを備える。容器保持手段10は、将来PCR装置との接続やPCR産物解析装置との接続等を考慮して、96本又はそれ以上の試料容器が挿入できるようにしたものであることが好ましい。試薬容器保持手段20は、レプリカ作製では少なくとも4本の試料容器挿入穴が設けてあることが望ましい。また、試薬容器保持手段20に設けられた容器挿入穴の数は、将来のPCR装置との接続やPCR産物解析装置との接続等を考慮すると、10本以上設けられていることが好ましい。容器保持手段10や試料容器保持手段20は、例えばペルチェ素子等を用いた容器液温度制御手段30や試薬容器温度制御手段40で温度制御することとを考慮して、熱伝導率の良いアルミ製ブロックであることが好ましい。

DNAライブラリー・チップを作製するためのチップ（基体）は、オリジナル・チップ及びレプリカ・チップとも、平板、球体、立方体、粒状などの形態のものであることが望ましい。さらに、その材質を特に指定するものではないが、反応液などと反応しないものあるいはDNA固定化反応に対する阻害物質析出しないものが望ましい。例えばプラスチック、ガラス、シリコン、金属などを材料とし、その形状は板状、球状、立方体状などである。特に好ましくは、ダイヤモンド、ダイヤモンドを含む炭素原子などから形成された基体である。

（cDNAライブラリーのオリジナル・チップ、及びそのレプリカ・チップの作製）

20 図1、図3を参照しながら、cDNAライブラリーを固定化させたオリジナル・チップ及びそのレプリカ・チップを作製する手順を説明する。まず、オリゴ（dT）_n（_nは15～30）を化学修飾した3mm×3mm×0.1mmサイズのチップを作製したい枚数（T₁～T_n）だけ用意する。これらのチップは、オリゴ（dT）_nに対する化学修飾のみがされているチップ（化学修飾チップ）であって、いまだcDNAライブラリーは固定化されていないものである。オリゴ（dT）_nが化学修飾されたチップを用いる理由は、化学修飾されたチップ上には、容易にTotal

RNAの内の mRNAがハイブリダイズされるからである。そして、これらのチップを容器CB1～CBn内に挿入して、その容器を容器保持手段10に設置する。この場合、1容器あたり1枚挿入するのが、少量の検体試料から得られる極微量のmRNAを用いて固定化cDNAライブラリーのオリジナルチップ及びそのレプリカチップを確実に作製する、という観点から望ましい。化学修飾チップを挿入した容器CB1～CBnを、容器保持手段10に設置する順序は、第1番目の挿入部HT1にオリジナル・チップ用の化学修飾チップT1の入った容器CB1を置き、第2番目以降の挿入部HT2～HTnに必要な枚数のレプリカ・チップ用の化学修飾チップ(T2～Tn)の入った容器(CB2～CBn)を順次整列して並べる。

(オリジナル・チップの作製)

まず、所定温度(例えば4℃)に保持された試薬容器保持手段20に、精製された Total RNA溶液201と逆転写酵素溶液202と、ヌクレオチド(dT, dA, dG, dC)を含む反応液203等を設置する。また、DNAの洗浄・溶出用のTE溶液(トリズマベースとEDTAを含む緩衝液)204、廃液槽210等を設置し、それぞれの溶液を液送するための溶液流路としてのキャピラリー管230を、送液切替手段220に接続する。キャピラリー管230は液体クロマトグラフィー用の耐腐食性のステンレス管等を用いることが望ましい。また送液手段105を通り試料注入注出用ノズル101を送液切替手段220との接続にはシリコンチューブ231を用いることが望ましい。次に、試料注入注出用ノズル101を、容器保持手段10のHT1の位置に移動させ、1番目のチップ(T1)の入った容器CB1の中にノズル101を挿入する。送液切替手段220を反応液203側に設定し、送液手段である送液手段105を駆動して反応液を容器CB1に注入する。送液切替手段220を Total RNA溶液201に切替え、所定量を送液手段105で注入する。所定温度(例えば20℃)以下で一定時間(例えば20～30分間)の静置の後に、送液切替手段220を逆転写酵素溶液(

酵素 1) 202 に切替え、所定量を送液手段 105 で注入する。試料注入注出用ノズル 101 を容器 CB1 から引き上げた後に、容器保持手段 10 の温度を所定温度（例えば約 42℃）にし、一定時間（例えば 30～60 分間）静置し、mRNA から cDNA を作製させる逆転写酵素反応を進行する。その後、容器保持手段 10 の温度を所定温度（例えば 20℃）以下にした後に、送液切替手段 220 を廃液槽 210 側に切替え、試料注入注出用ノズル 101 を容器 CB1 に挿入し、送液手段 105 を駆動して容器 CB1 内にある反応液を廃液層 210 に排出する。送液切替手段 220 を TE 溶液 204 側に切替え、送液手段 105 を駆動して所定量の TE 溶液 204 を容器 CB1 内に注入し、その後送液切替手段 220 を廃液槽 210 側に切替え、容器 CB1 内の TE 溶液を廃液層 210 に排出する。上記の操作を数回（5 回以上が好ましい）繰返して、オリジナルの cDNA ライブラリー・チップの作製が完了する。この段階では、固定化 cDNA ライブラリー作製に利用された mRNA は、まだ DNA にハイブリダイズされた状態で保持されている。次に、固定化 cDNA ライブラリーにハイブリダイズされている mRNA を脱ハイブリダイズさせ分離溶出するために、送液切替手段 220 を TE 溶液 204 側に切替え送液手段 105 を駆動して所定量の TE 溶液 204 を容器 CB1 に注入する。溶液温度制御手段 30 を駆動させて容器保持手段 10 の温度を所定温度（例えば 90℃）にまで上昇させて、mRNA をハイブリダイズさせる。その後、送液切替手段 220 を mRNA に対する一時保留容器 206 側に切替え、送液手段 105 を駆動して、脱ハイブリダイズされた mRNA 溶液をその一時保留容器 206 に移動させる。

（レプリカ・チップの作製）

次に、前記の方法によって作成されたオリジナルの cDNA ライブラリー・チップから脱ハイブリダイズされた mRNA を再利用して、そのレプリカ・チップを作製する方法を説明する。まず、試料注入注出用ノズル 101 を容器 CB1 から引き上げた後に、そのノズル 101 を次のレプリカ用チップ（T2）の入った

容器 C B 2 に移動させ、送液手段 1 0 5 を逆方向に駆動させ一時保留した m R N A 溶液 2 0 6 を容器 C B 2 に注入する。その後、上記したオリジナル・チップの作製方法で説明した工程を繰り返す。ただし、後半の Total R N A 溶液 2 0 1 の注入工程は、一時保留した m R N A の注入工程と置き換わるため省略することができる。すなわち、この容器 C B 2 に、送液切替手段 2 2 0 を反応液 2 0 3 側に設定し、送液手段である送液手段 1 0 5 を駆動して反応液を容器 C B 2 に注入する。所定温度（例えば 2 0 ℃）以下で一定時間（例えば 2 0 ～ 3 0 分間）の静置の後に、送液切替手段 2 2 0 を逆転写酵素溶液（酵素 1）2 0 2 側に切替え、所定量を送液手段 1 0 5 で注入する。試料注入注出用ノズル 1 0 1 を容器 C B 2 から引き上げた後に、容器保持手段 1 0 の温度を所定温度（例えば約 4 2 ℃）にし、一定時間（例えば 3 0 ～ 6 0 分間）静置する。容器保持手段 1 0 の温度を室温（2 0 ℃）以下にした後に、送液切替手段 2 2 0 を廃液槽 2 1 0 側に切替え、試料注入注出用ノズル 1 0 1 を容器 C B 2 に挿入し、送液手段 1 0 5 を駆動して容器 C B 2 内にある反応液を廃液層 2 1 0 に排出する。送液切替手段 2 2 0 を T E 溶液 2 0 4 側に切替え、送液手段 1 0 5 を駆動して所定量の T E 溶液 2 0 4 を容器 C B 2 内に注入し、その後送液切替手段 2 2 0 を廃液槽 2 1 0 側に切替え、容器 C B 2 内の T E 溶液を廃液層 2 1 0 に排出する。上記の操作を数回（5 回以上が好ましい）繰り返す。このようにして、オリジナルの c D N A ライブラリー・チップを複製した 1 枚目のレプリカ・チップが作製される。上記のレプリカ・チップ作製のためのサイクリックな操作を必要回数繰り返して必要とする枚数のレプリカ・チップを作製する。図 2 は、g D N A ライブラリー・チップの作製と複製とを自動的に行うことができる装置の概略を示す。図 2 の D N A ライブラリー・チップ作製装置は、反応液等を容器に送液するための送液手段 1 0 5 と、反応液を切り替えて送液するための送液切替手段 2 2 0 と、試料注入注出用ノズル 1 0 1 を平面内の前後左右方向や上下方向等に駆動させることができるノズル駆動手段 1 0 0 と、チップの入った容器を保持するための容器保持手段 1 0 と、前記容

器中の反応液を加熱冷却する容器液温度制御手段30と、固定化DNAライブラリー・チップの作製のための試料や試薬等の入った容器を保持するための試薬容器保持手段20と、前記試薬容器保持手段を所定温度に保持するための試薬容器温度制御手段40、などを備える。容器保持手段10は、将来のPCR装置との接続やPCR産物解析装置の接続等を考慮して、96本又はそれ以上の試料容器が挿入できるようにしたものであることが好ましい。試薬容器保持手段20は、レプリカ作製では少なくとも4本の試料容器挿入穴が設けてあることが望ましい。また、試薬容器保持手段20に設けられた容器挿入穴の数は、将来のPCR装置との接続やPCR産物解析装置との接続等を考慮すると、10本以上設けられていることが好ましい。容器保持手段10や試料容器保持手段20は、例えばペルチェ素子等を用いた容器液温度制御手段30やで温度制御することを考慮して、熱伝導率の良いアルミ製が好ましい。

(gDNAライブラリーのオリジナル・チップ、及びそのレプリカ・チップの作製)

図2、図5を参照して、gDNAライブラリーを固定化させたオリジナル・チップ及びそのレプリカ・チップを作製する場合を説明する。まず、制限酵素部位所有のオリゴヌクレオチド（センス部分）を化学修飾したチップ（その大きさは、例えば3mm×3mm×0.1mm）を作製したい枚数（T1～Tn）用意する。オリジナル・チップ（T1）に対しては、そのオリゴヌクレオチド（アンチセンス部分）をハイブリダイズさせた後に、制限酵素処理を行い、完全な制限酵素部位を前もって作っておく。オリジナル・チップT1を挿入した容器CB1と、制限酵素部位所有のオリゴヌクレオチド（センス部分）を化学修飾した化学修飾チップ（レプリカ用チップ）T2～Tnとを容器CB2～CBn内に挿入して、溶液保持手段10に設置する。その設置順序は、第1番目の挿入部HT1にオリジナル・チップT1の入った容器CB1を置き、第2番目以降に必要枚数のレプリカ用チップの入った容器CB2～CBnを順次整列して並べる。所定温度（例えば

4℃)に固定された試薬容器保持手段20に、精製された制限酵素処理済みgDNAライブラリー溶液306と、DNAリガーゼ(Ligase)溶液(酵素1)305と、DNAポリミラーゼ(Polymerase)溶液(酵素2)302と、ヌクレオチド(dT, dA, dG, dC)を含む反応液303等を設置する。また、DNAの洗浄・溶出用のTE溶液(トリズマベースとEDTAを含む緩衝液)304と、廃液槽310などを設置し、それぞれの溶液の溶液流路としてのキャピラリー管330を送液切替手段220に接続する。そのキャピラリー管230は液体クロマトグラフィー用の耐腐食性ステンレス管を用いることが望ましい。また、キャピラリー管230の先には、送液手段105を介して、送液切替手段220、試料注入注出用ノズル101、などを接続する。その接続にはシリコンチューブ231を用いることが望ましい。試料注入注出用ノズル101を、容器保持手段10のHT1の位置に移動させ、第1番目のチップ(T1)の入った容器CB1の中にノズル101を挿入する。送液切替手段220を反応液303側に設定し、送液手段105を駆動して所定量(例えば17 μ L)の反応液303を容器CB1に注入する。送液切替手段220を、制限酵素処理されたgDNAライブラリー溶液306側に切替え、所定量(例えば2 μ L)を送液手段105で注入する。所定温度(例えば20℃)以下で一定時間(例えば20~30分間)の静置の後、送液切替手段220をDNAリガーゼ溶液(酵素1)305側に切替え、所定量(例えば1 μ L)を送液手段105で容器CB1内注入する。試料注入注出用ノズル101を容器CB1から引き上げた後に、容器保持手段10の温度を所定温度(例えば37℃)にし、一定時間(例えば30~60分間)の静置し、DNAリガーゼによる固定化されたgDNAライブラリーをチップT1上に作製する。容器保持手段10の温度を所定温度(例えば20℃以下)にした後に、送液切替手段220を廃液槽310側に切替え、試料注入注出用ノズル101を容器CB1内に挿入し、送液手段105を駆動してCB1内の反応液を排出する。送液切替手段220をTE溶液304側に切替え、送液手段105を駆動して所定

量（例えば500 μ L）のTE溶液を容器CB1内に注入し、その後送液切替手段220を廃液槽310側に切替え、容器CB1内のTE溶液を排出する。この操作を数回（例えば5回以上）繰返して、固定化チップT1を洗浄する。固定化チップT1の洗浄後、送液切替手段220を反応液303側に切替え、送液手段105を駆動して所定量（例えば19 μ L）の反応液を容器CB1内に注入する。次に、容器保持手段10を所定温度（例えば90℃）に上昇させ、一定時間（例えば10～20分間）の静置によって、固定化gDNAライブラリー（センスとアンチセンスの2本鎖）からアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後に、送液切替手段220を、gDNAライブラリー（アンチセンス部分）を一時保留する容器306側に切替え、送液手段105を駆動させて、gDNAライブラリー（アンチセンス部分）溶液を容器CB1から注出する。この段階で1枚目のgDNAライブラリー（センス部分）・チップ（オリジナル・チップ）が作製完了になる。

（レプリカ・チップの作製）

試料注入注出用ノズル101を容器CB1から引き上げた後に、ノズル101を次のレプリカ用チップ（T2）の入った容器CB2に移動させ、一時保留したgDNAライブラリー（アンチセンス部分）溶液306をその容器CB2に注入する。上記のレプリカ・チップ作製のための上記のサイクリックな操作を必要回数繰返して必要とする枚数のレプリカ・チップを作製する。しかし、下記に説明する実施例2では、レプリカ作製段階で、DNAポリミラーゼ溶液（酵素2）302側に切替え、所定量（例えば1 μ L）を送液手段105で容器CB2内に注入する点に注意する。

実施例

（実施例1）

図1、図3、図4を参照しながら、オリジナルの固定化cDNAライブラリー・チップ及びそのレプリカ・チップの作製について説明する。まず、試料の前処

理として、①細胞・組織の破壊および②Total RNAの精製をすることによって試料の用意を行った（図3のS1）。すなわち、固定化cDNAライブラリー・チップ作製のための試料の前処理段階として、約5mm角のラット肝臓組織を市販の試薬キットのISOGEN（株式会社ニッポンジーン製）中でホモジナイズし、以下そのプロトコールに従ってTotal RNAを精製した。また、オリゴ（dT）_n（*n*は15～30）の化学修飾のみをした3mm×3mm×0.1mmサイズのチップを10枚（T1～T10）用意した（図3のS2）。この固定化は、表面にアミノ基を付加したチップ（T1～T10）を、活性化した二価カルボン酸溶液で処理し、エタノール・蒸留水で順次洗浄した後、そのチップをオリゴ（dT）_n水溶液中に入れて室温に10分間保持した。その後これらのチップ（T1～T10）を、1枚ずつそれぞれ別々の容器CB1～CB10内に、挿入して、容器CB1～CB10を温度制御用器用アルミブロック10に設置した。次に、4℃に固定された低温試料用アルミブロック20内に、精製されたTotal RNA溶液201と逆転写酵素溶液202、ヌクレオチド（dT, dA, dG, dC）を含む反応液203を設置した。また、低温試料用アルミブロック20外に、DNAの洗浄用のTE液（トリズマベースとEDTAを含む緩衝液）204、及び廃液槽210を設置した。そして、Total RNA溶液201、逆転写酵素溶液202、反応液203、TE液204、廃液槽210をキャピラリー管230で自動型八方切替バルブ220に接続した。試料注入注出用キャピラリー針101を、温度制御器用アルミブロック10のHT1の位置に移動させ、1番目のチップT1（オリジナルチップ）の入った容器CB1の中にキャピラリー針101を挿入した。自動型八方切替バルブ220を反応液203側に設定し、ペリスタ型ポンプ105を駆動して17μLの反応液を容器CB1に注入した。自動型八方切替バルブ20をTotal RNA溶液201に切替え、その2μLをペリスタ型ポンプ105で注入し、チップ表面上に固定化されたオリゴ（dT）_nとTotal RNA溶液中のmRNAとをハイブリダイズさせるために、20℃で20分間、静置した（図

3のS3及び図4(a)参照)。静置後、自動型八方切替バルブ220を逆転写酵素溶液202側に切替え、逆転写酵素溶液202の1 μ Lをペリスタ型ポンプ105で注入した。試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1から引き上げた後に、容器保持手段10の温度を42℃にし、30min間の静置し、逆転写酵素によるチップT1上に固定化されたcDNAライブラリー(固定化チップ)を作製した(図3のS4及び図4(b)参照)。容器保持手段10の温度を再び20℃にした後に、自動型八方切替バルブ220を廃液槽210側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1に挿入し、ペリスタ型ポンプ105を駆動して容器CB1内にある反応液を廃液槽210に排出した。自動型

10 八方切替バルブ220をTE液204側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して500 μ LのTE液204を容器CB1内に注入し、その後自動型八方切替バルブ220を廃液槽210側に切替え、容器CB1内のTE液を廃液槽210に排出した。この操作を数回(5回以上)繰返して、固定化チップT1を洗浄した(図3のS5)。固定化チップT1の洗浄後、自動型八方切替バルブ220

15 針を反応液203側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して19 μ Lの反応液203を容器CB1内に注入した。次に、容器保持手段10の温度を90℃に上昇させ、10分間の静置によって、固定化cDNAライブラリーからmRNAを脱ハイブリダイズさせた(図3のS6及び図4(d)参照)。次に、自動型八方切替バルブ220をmRNAを一時保留する容器206側に切替え、ペリスタ

20 型ポンプ105を駆動させて、脱ハイブリダイズしたmRNA溶液を容器CB1から分離注出し容器206に一時保留した(図3のS7)。以上の工程によって、cDNAライブラリーを固定化した1枚目のcDNAライブラリー・チップ(オリジナル・チップ)を作製した(図3のS8及び図4(c)参照)。次に、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1から引き上げた後に、キャピラ

25 リー針101を次のレプリカ用チップ(T2)の入った容器CB2に移動させた。レプリカ用チップ(T2)は、予め前述した化学修飾が施されているものを用

いた。自動型八方切替バルブ 2 2 0 を一時保留容器 2 0 6 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して、 $19\mu\text{L}$ の一時保留 mRNA 溶液を容器 C B 2 中に注入した（図 4 の（d）から（a）への矢印” R” 参照）。次に、固定化オリゴ（dT）_n と mRNA とのハイブリダイズのために、 20°C で 2 0 分間の静置の後

に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を逆転写酵素溶液 2 0 2 側に切替え、逆転写酵素溶液 2 0 2 の $1\mu\text{L}$ をペリスタ型ポンプ 1 0 5 で容器 C B 2 中に注入した（図 3 の S 9）。試料注入注出用キャピラリー針 1 0 1 を容器 C B 2 から引き上げた後に、容器保持手段 1 0 の温度を 42°C にし、3 0 min 間の静置し、逆転写酵素によってチップ T 2 上に固定化された c DNA ライブラリーを作製した（図 3 の S 1 0 及び図 4（b）参照）。容器保持手段 1 0 の温度を再度 20°C にした後に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を廃液槽 2 1 0 側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針 1 0 1 を容器 C B 2 に挿入し、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して容器 C B 2 内にある反応液を廃液槽 2 1 0 に排出した。自動型八方切替バルブ 2 2 0 を T E 液 2 0 4 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して $500\mu\text{L}$ の T E 液 2 0 4 を容器 C B 2 内に注入し、その後自動型八方切替バルブ 2 2 0 を廃液槽 2 1 0 側に切替え、容器 C B 2 内の T E 液を排出した。この操作を 5 回繰返して、固定化チップ T 2 を洗浄した（図 3 の S 1 1）。固定化チップ T 2 の洗浄後、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を反応液 2 0 3 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して $19\mu\text{L}$ の反応液 2 0 3 を容器 C B 2 内に注入した。次に、容器保持手段 1 0 の温度を 90°C に上昇させ、1 0 分間の静置によって、固定化 c DNA ライブラリーから mRNA を脱ハイブリダイズさせた（図 3 の S 1 2）。次に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を mRNA を一時保留する容器 2 0 6 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動させて、脱ハイブリダイズした mRNA 溶液を容器 C B 2 から分離注出し（図 4（d）参照）、容器 2 0 6 に一時保留した（図 3 の S 1 3）。以上の工程により、複製 c DNA ライブラリー・チップ（レプリカ・チップ）を作製した（図 3 の S 1 4 及び図 4（c）参照）。チップ T 3

～T 1 0の入った容器C B 3～C B 1 0についても同様にして、上記操作S 9～S 1 4を順次繰り返して、さらに8枚のレプリカ・チップを順次作製した。ラット肝組織細胞のc D N Aライブラリーを固定化させたチップ（T 1～T 1 0）を用いて、1 8 S r R N Aに対するP C R装置で遺伝子増幅を行い、電気泳動装置を用いてc D N Aライブラリーが固定化されていることを確認した。その結果、オリジナル・チップT 1及びレプリカ・チップT 2～T 1 0とも正常なc D N Aライブラリー・チップとして作製されていたことが確認できた。

（実施例2）

図2、図5、図6、図7を参照しながら、オリジナルの固定化g D N Aライブラリー・チップ及びそのレプリカ・チップの作製について説明する。まず、試料の前処理として、①細胞・組織の破壊及び②染色体D N A（g D N A）の精製・制限酵素処理をし試料の用意を行った（図5のS 2 1）。また、チップ上に目的制限酵素部位の塩基配列をもったオリゴヌクレオチドのセンス部分を化学修飾したチップを1 0枚を用意した。大きさはおよそ3mm×3mm×0.1 mmのものである（図5のS 2 2）。このチップを概念的に表したものが図6（d）の破線で囲まれた部分で示すチップfである。その部分を拡大して示したものが図7である。次に、上記の化学修飾したチップのうちの一個を用いて、そのオリゴヌクレオチドのアンチセンス部分をハイブリダイズさせた後に、制限酵素処理を行い、完全な制限酵素切断部位をもったチップ（T 1）を一個作製した（図5のS 2 3及び図6の（d）から（a）への矢印①参照）。このチップを概念的に表したものが図6（a）の破線で囲まれた部分で示すチップeである。その部分を拡大して示したものが図8である。前記チップT 1を挿入した容器C B 1と、前記制限酵素部位を所有したオリゴヌクレオチドのセンス部分だけを化学修飾したチップ9枚（T 2～T 1 0）をそれぞれ挿入した容器C B 2～C B 1 0とを、容器保持手段1 0に設置した。次に、図2に示すように、4℃に固定された低温試料用アルミブロック2 0内に、精製された制限酵素処理済みg D N Aライブラリー溶液3 0

6、DNA溶液（酵素1）305、DNAポリミラーゼ溶液（酵素2）302、ヌクレオチド（dT, dA, dG, dC）を含む反応液303に設置した。また、低温試料用アルミブロック20外に、DNAの洗浄・溶出用のTE液304、廃液槽310を設置した。そして、図2に示すように、gDNAライブラリー溶液306、DNAリガーゼ溶液（酵素1）305、DNAポリミラーゼ溶液（酵素2）302、ヌクレオチド（dT, dA, dG, dC）を含む反応液303、DNAの洗浄・溶出用のTE液304、廃液槽310を、キャピラリー管230で自動型八方切替バルブ220に接続した。試料注入注出用キャピラリー針101を、温度制御容器用アルミブロック10のHT1の位置に移動させ、1番目のチップT1（オリジナル・チップ）の入った容器CB1の中にそのキャピラリー針101を挿入した。自動型八方切替バルブ220を反応液303側に設定し、ペリスタ型ポンプ105を駆動して17 μ Lの反応液303を容器CB1に注入した。自動型八方切替バルブ220を制限酵素処理されたgDNAライブラリー溶液306側に切替え、その2 μ Lをペリスタ型ポンプ105で注入した。20℃で20分間の静置の後に、自動型八方切替バルブ220をDNAリガーゼ溶液（酵素1）305側に切替え、その1 μ Lをペリスタ型ポンプ105で容器CB1内に注入した。試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1から引き上げた後に、容器保持手段10の温度を37℃にし、30分間の静置し、DNAリガーゼによる固定化されたgDNAライブラリーをチップ（T1）上に作製した。（図5のS25、及び図6の（a）から（b）へ移行する工程矢印②参照）。容器保持手段10の温度を20℃にした後に、自動型八方切替バルブ220を廃液槽310側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1内に挿入し、ペリスタ型ポンプ105を駆動してCB1内の反応液を排出した。自動型八方切替バルブ220をTE液304側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して500 μ LのTE液を容器CB1内に注入し、その後自動型八方切替バルブ220を廃液槽310側に切替え、容器CB1内のTE液を排出した。この操作を5回以上

繰返して、チップ（T1）を洗浄した（図5のS26）。チップ（T1）の洗浄後、自動型八方切替バルブ220を反応液303側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して19 μ Lの反応液を容器CB1内に注入した。温度制御容器用アルミブロック10の温度を90℃に上昇させ、10分間の静置によって、センスとアンチセンスの2本鎖からなる固定化gDNAライブラリーからアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた（図5のS27、及び図6の（b）から（c）へ移行する工程矢印③参照）。そして、自動型八方切替バルブ220を一時保留する容器306側に切替えて、ペリスタ型ポンプ105を駆動させて、アンチセンス部分のgDNAライブラリー溶液を容器CB1から注出した（図5のS29、及び図6の（b）から（d）への移行矢印（液）参照）。一方、チップ（T1）上には、センス部分のみが固定化された、1枚目の一本鎖gDNAライブラリー・チップT1（オリジナル・チップ）を作製した（図5のS28及び図6の（c））。次に、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1から引き上げた後に、キャピラリー針101を次のチップ（T2）の入った容器CB2に移動させ、20℃に保温した容器CB2にヌクレオチドを含む反応液を加え、一時保留したアンチセンス部分のみのgDNAライブラリー溶液306を容器CB2内に注入し、20分間保温した（図5のS30）。次に、DNAポリミラーゼを添加して、37℃に温度を上げて1時間保温した。この結果、チップ（T2）上に、センス部分が固定化された二本鎖のgDNAライブラリーが作製された（図5のS31及び図6の（d）から（b）へ移行する工程矢印④参照）。次に、上記二本鎖のgDNAライブラリーが固定化されたチップT2の挿入された容器CB2を、20℃にした後に、自動型八方切替バルブ220を廃液槽310側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB2内に挿入し、ペリスタ型ポンプ105を駆動してCB2内の反応液を排出した。自動型八方切替バルブ220をTE液304側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して500 μ LのTE液を容器CB2内に注入し、その後自動型八方切替バルブ220を廃液槽

310側に切替え、容器CB2内のTE液を排出した。この操作を5回以上繰返して、チップ(T2)を洗浄した(図5のS32)。チップ(T2)の洗浄後、自動型八方切替バルブ220を反応液303側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して19 μ Lの反応液を容器CB2内に注入した。アルミブロック105の温度を90℃に上昇させ、10分間の静置によって、センスとアンチセンスの2本鎖からなる固定化gDNAライブラリーからアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた(図5のS33、及び図6の(b)から(c)へ移行する工程矢印⑤参照)。そして、自動型八方切替バルブ220を一時保留する容器306側に切替えて、ペリスタ型ポンプ105を駆動させて、アンチセンス部分のgDNAライブラリー溶液を容器CB2から注出した(図5のS35、及び図6の(b)から(d)へ移行する工程矢印(液)参照)。チップ(T2)上にセンス部分のみが固定化された、2枚目の複製品である1本鎖gDNAライブラリー・チップT2(レプリカ・チップ)を作製した(図5のS34、及び図6(c)参照)。

以上のような繰返しの操作を行うことによって、チップ上に2本鎖のgDNAライブラリーを固定化し、その後2本鎖からなる固定化gDNAライブラリーからアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせて1本鎖gDNAライブラリー・チップ(レプリカ・チップ)を、残りの枚数(T3~T10)作製することができた。すなわち、図6に示す(b)→(d)→(b)→(d)→...の工程を繰返すことにより、チップ上に同一の1本鎖gDNAライブラリーを固定化したチップ(図6(c)で示す)を何枚でも複製できる。

産業上の利用可能性

本発明の装置を用いれば、発現しているmRNAからのcDNAライブラリー及び染色体DNAの制限酵素処理されたgDNAライブラリーに対する固定化DNAチップの作製が容易なだけでなく、従来の溶液状態でのDNAライブラリーでは作製することが不可能であったそれらのレプリカが固定化DNAチップとし

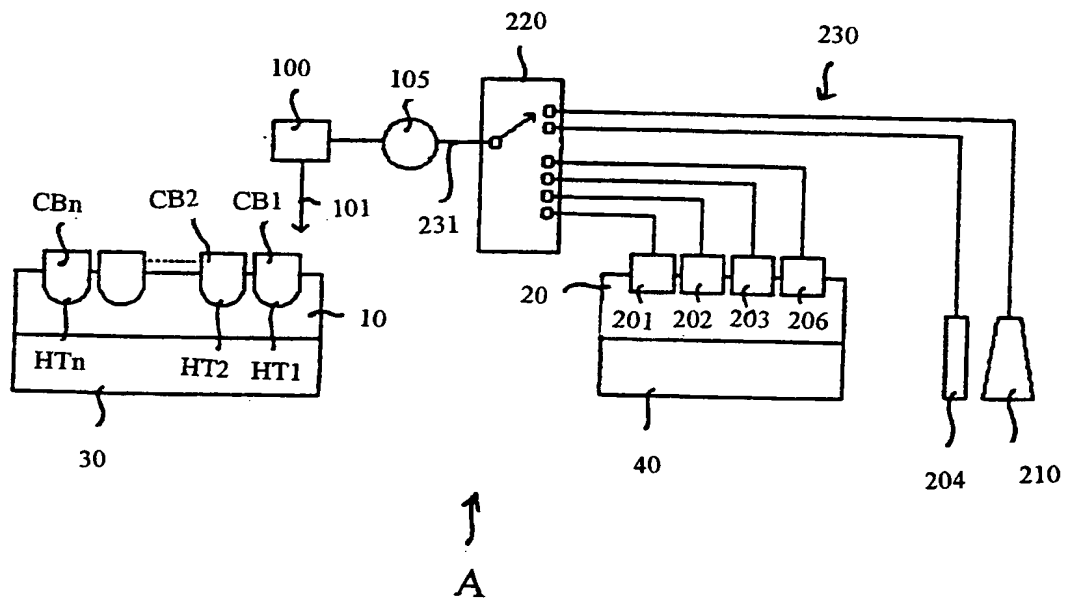
て必要枚数だけ（原則的には、mRNA及びgDNAが化学的・物理的に分解されない限り無制限に作製可能）、簡単にしかも短時間に作製できる。また、1回の培養細胞からの少量の遺伝子試料の採取或いは貴重な検体組織からの一度の遺伝子試料の採取によって、固定化DNAライブラリー・チップ及びその何枚ものレプリカ・チップが作製でき、同一試料による何種類もの遺伝子研究や遺伝子検査が容易に行なえるようになってくるといふ計り知れない利益が生じてくる。さらに、固定化DNAライブラリー・チップ及びそのレプリカ・チップの利用によって、将来の遺伝子診断技術の開発における経費的な節減や大幅な省力化での飛躍的な発展が期待される。また、遺伝子診断に供する患者からの一度の血液採取
10 や組織摘出手術で半永久的な複数の固定化DNAライブラリー・チップが作製できることにより、予防医学的な検査等に対するその再利用も簡単に行なえるようになる。このことは、患者本人に対する精神的及び経済的な苦痛を最小限にとどめるといふ非常に大きな利益になる。

請 求 の 範 囲

1. 基体上のオリゴ（d T）_nにmRNAをハイブリダイズさせた後、逆転写酵素を作用させて、相補的なDNAを固定化させるcDNAライブラリー作製方法。
2. 基体上に固定化したcDNAライブラリーからmRNAを脱ハイブリダイズさせ、そのmRNAを用いて、前記cDNAライブラリーと同一のcDNAライブラリーを固定化させるcDNAライブラリー作製方法。
3. 制限酵素部位を有した基体上のオリゴヌクレオチドに、二本鎖の染色体DNAライブラリーをライゲーションさせた後、gDNAライブラリーを固定化させるgDNAライブラリー作製方法。
4. 請求項3で作製した基体上のgDNAライブラリーの固定化センス部分を用いて作製する一本鎖gDNAライブラリー作製方法。
5. 請求項3で作製したgDNAライブラリーのアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後、そのアンチセンス部分を用いて基体上にセンス部分を合成固定化させる一本鎖gDNAライブラリー作製方法。
6. 前記基体が、あらかじめヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが化学修飾されたものである請求項1～5のいずれかの方法。
7. 請求項1～6のいずれかの方法によって作製されたDNAライブラリーを固定化した基体。
8. 一本鎖のDNAライブラリーが固定化された基体。

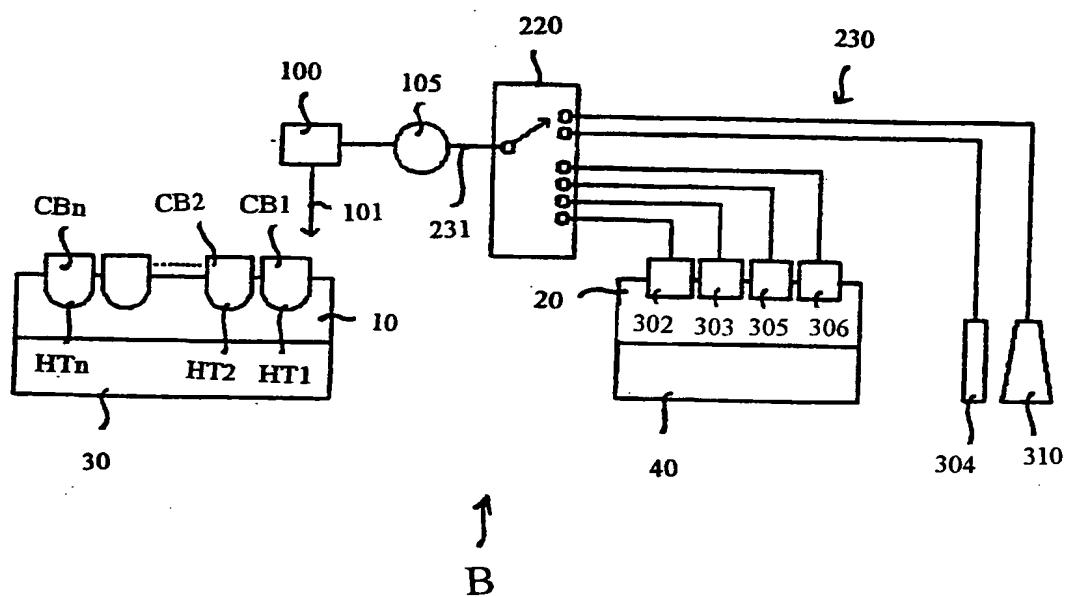
1 / 8

第1図

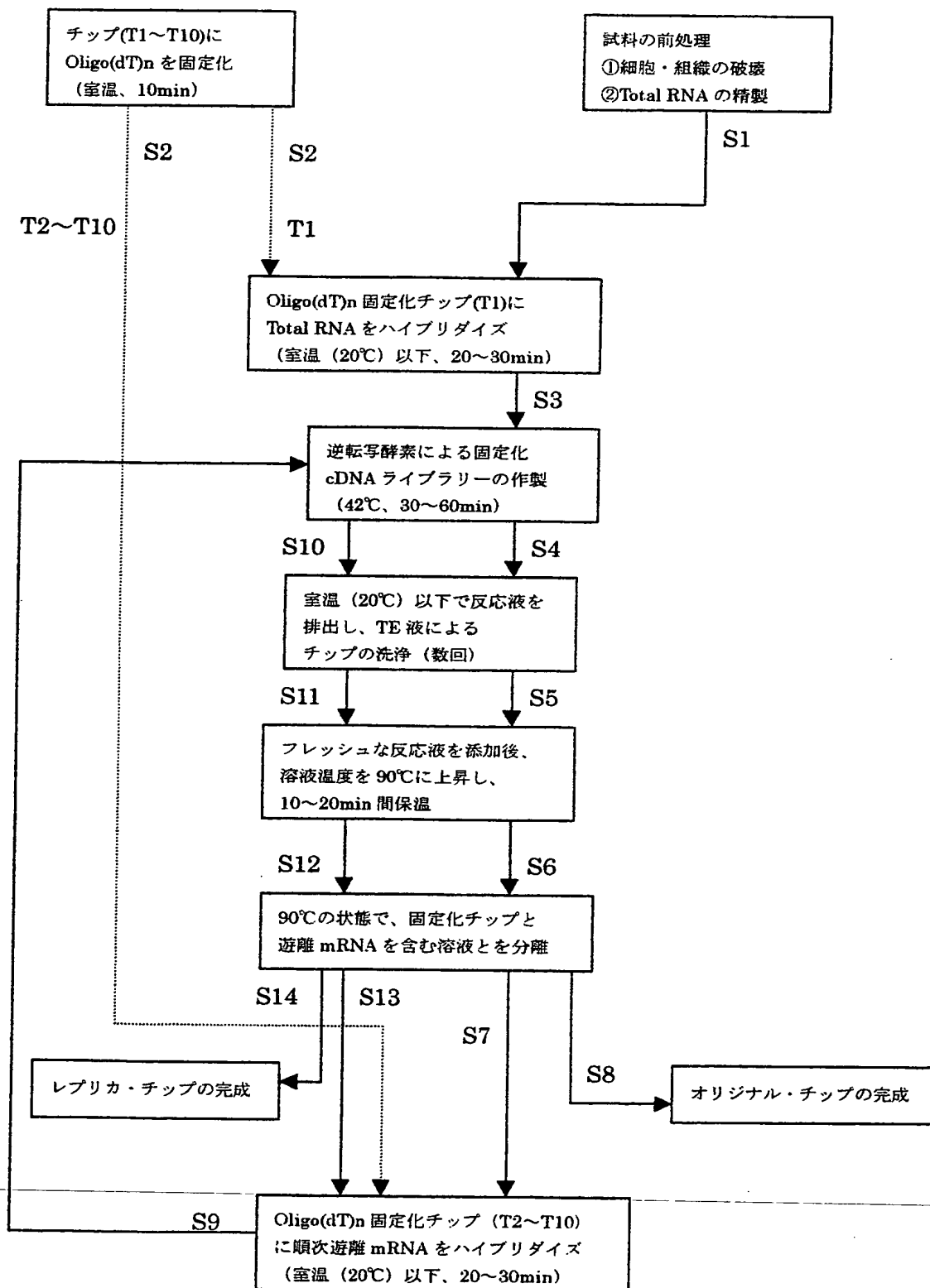


2 / 8

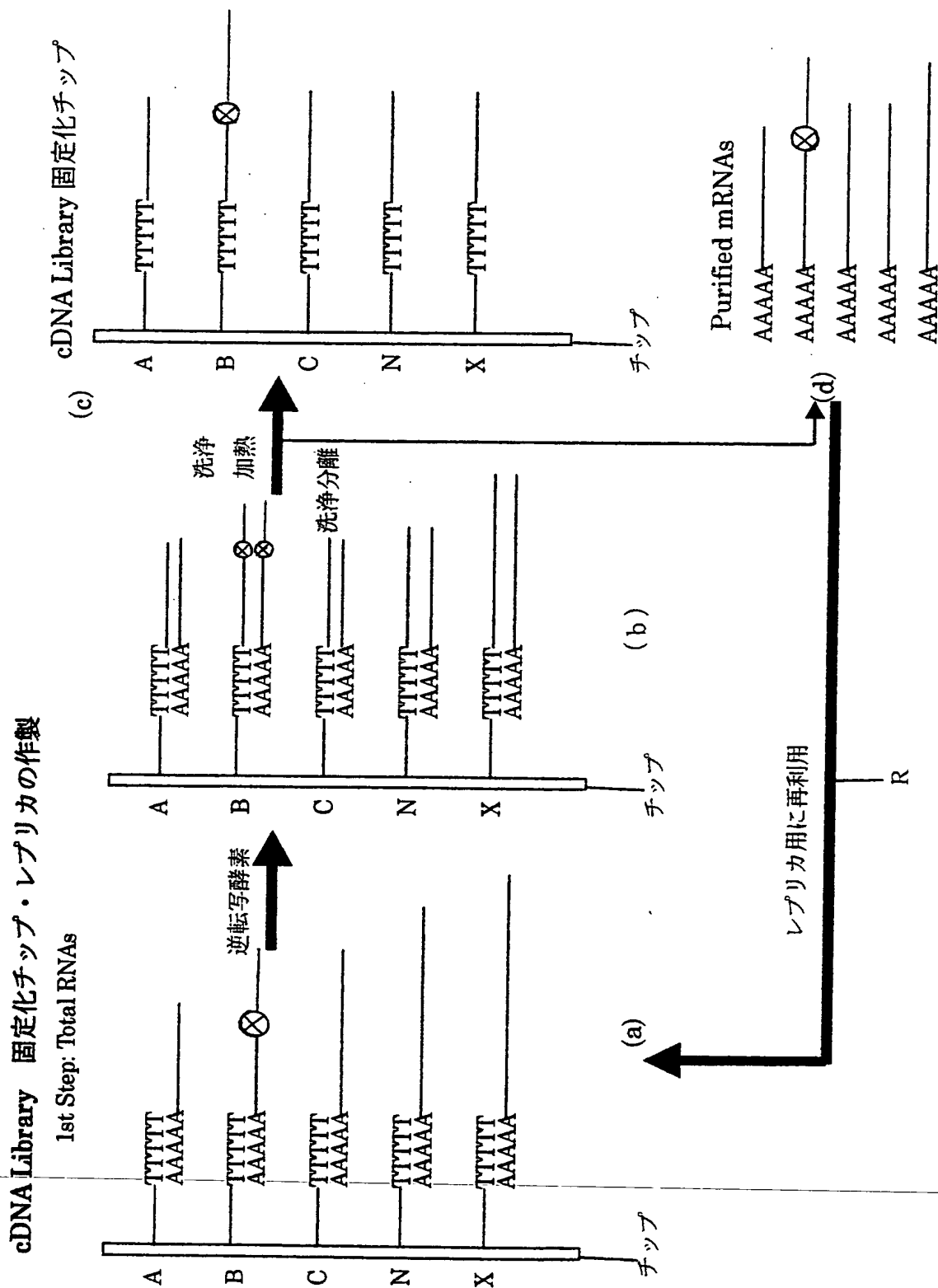
第 2 図



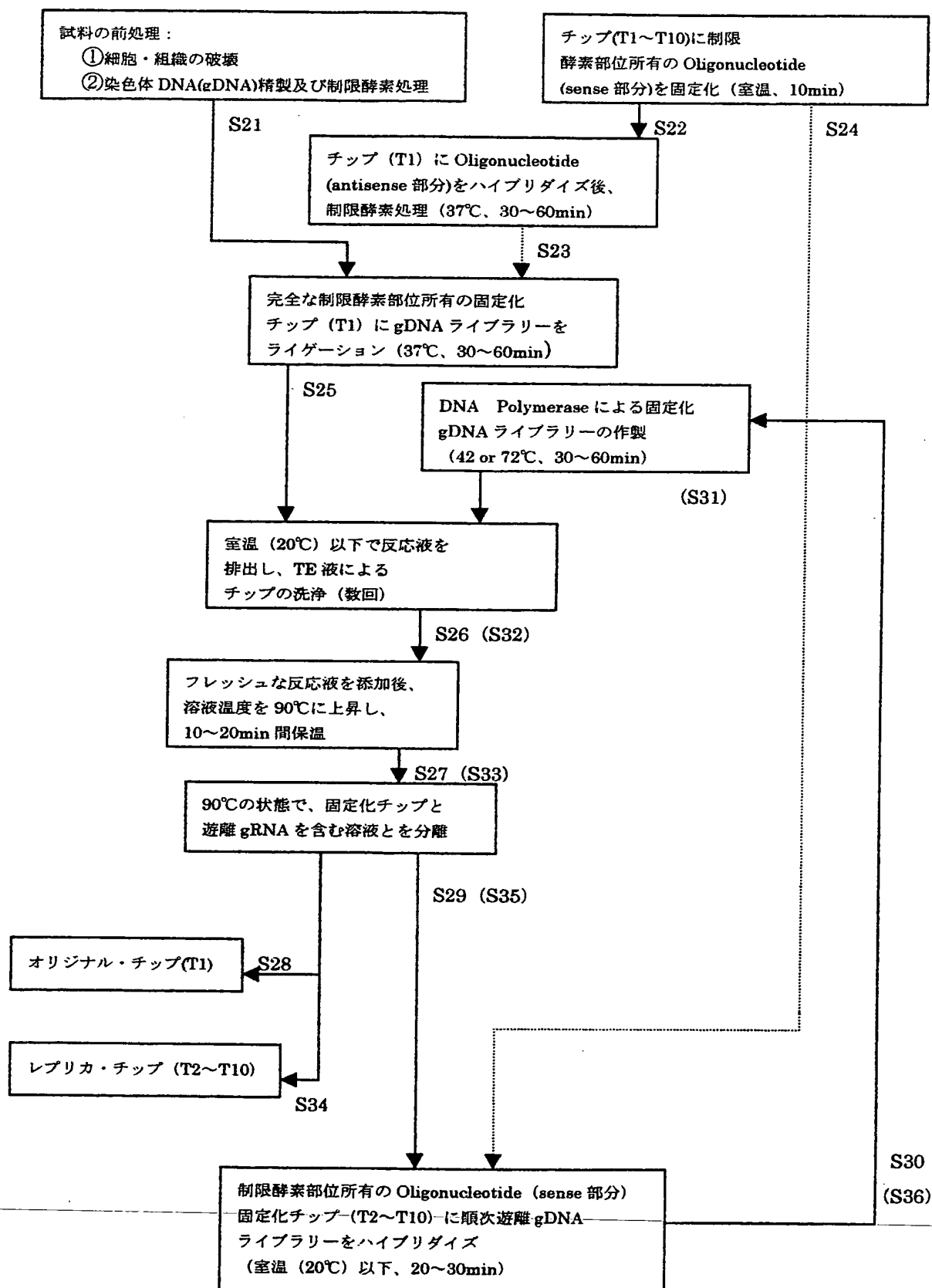
第3図



第4図

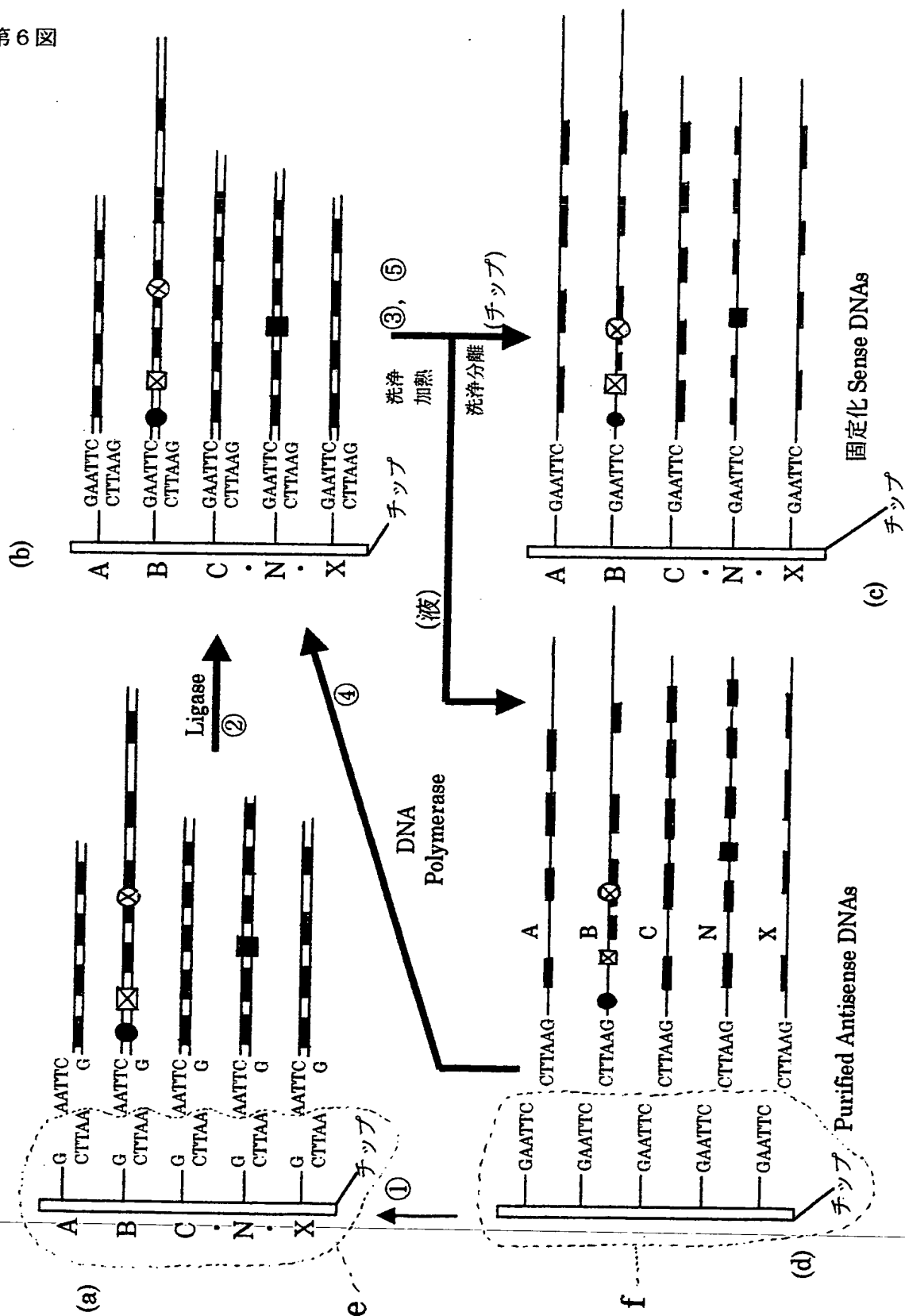


第5図



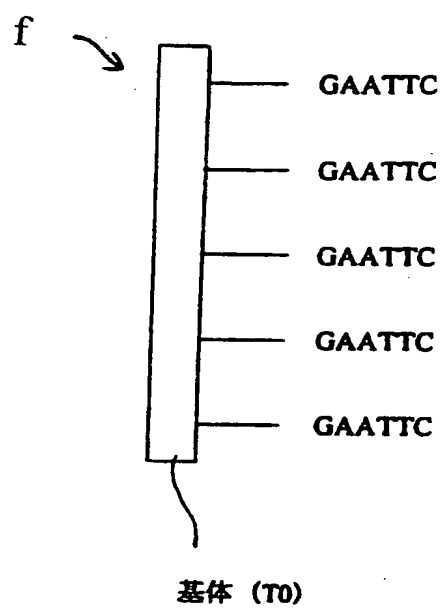
第6図

gDNA Library 固定化チップ・レプリカの作製



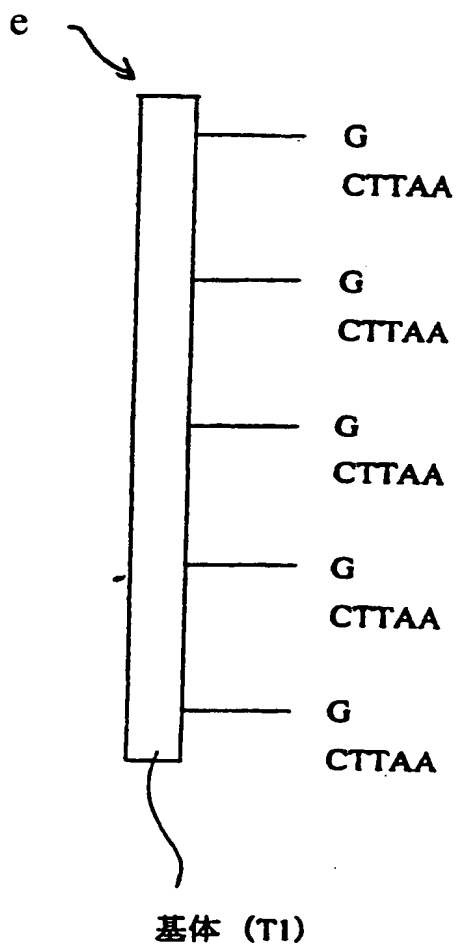
7 / 8

第 7 図



8 / 8

第 8 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP00/03000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG) , MEDLINE (STN) ,
JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| PX | WO, 99/63072, A1 (Toyo Kohan Co., Ltd.), 09 December, 1999 (09.12.99) & AU, 9940596, A | 1-8 |
| PX | WO, 99/41362, A1 (Toyo Kohan Co., Ltd.), 19 August, 1999 (19.08.99) & AU, 9921872, A | 1-8 |
| X | Schena, M. et al., "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), Vol. 93, pp. 10614-10619 | 8 |
| A | EP, 701001, A (Hitachi, Ltd.), 19 March, 1996 (19.03.96) & JP, 8-70898, A & CN, 1127887, A | 3-8 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 August, 2000 (01.08.00)Date of mailing of the international search report
15 August, 2000 (15.08.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| PX | WO, 99/63072, A1 (東洋鋼板株式会社) 9. 12月. 1999 (09. 12. 99) & A U, 9940596, A | 1-8 |
| PX | WO, 99/41362, A1 (東洋鋼板株式会社) 19. 8月. 1999 (19. 08. 99) & A U, 9921872, A | 1-8 |
| X | Schena, M. et al. "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 第93巻 p. 10614-10619 | 8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 08. 00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4 N

9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリ* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | EP, 701001, A (株式会社日立製作所) 19. 3月. 1996 (19. 03. 96) & J P, 8-70898, A & CN, 1127887, A | 3-8 |

13T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference 1676PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP00/03000 | International filing date (day/month/year) 10 May 2000 (10.05.00) | Priority date (day/month/year) 10 May 1999 (10.05.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/00, C12Q 1/68, C12M 1/34 | | |
| Applicant TOYO KOHAN CO., LTD. | | |

| | |
|--|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> | |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> | |

| | |
|---|---|
| Date of submission of the demand 08 December 2000 (08.12.00) | Date of completion of this report 06 April 2001 (06.04.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03000

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
- ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.

2. ☒ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. **X** Additional observations, if necessary:

The inventions set forth in Claims 1, 3, and 4, and in Claims 7 and 8, which cite those Claims, are described in the Specification and Drawings of a patent application filed in Japan as Japanese Patent Application No. 10-42971, and therefore, Japanese Patent Application No. 11-127943, which forms the basis for the priority claim in this international application, was not the first application filed in accordance with the Paris Convention, Article 4 Section C (2). Therefore, this examination finds that the priority claim for inventions set forth in Claims 1, 3, and 4, and in Claims 7 and 8, which cite those Claims, is invalid and the international filing date shall be considered the standard date.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03000

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|-----------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 2,5,6 | YES |
| | Claims | 1,3,4,7,8 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 2,5,6 | YES |
| | Claims | 1,3,4,7,8 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-8 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Document 1 [WO, 99/63072, A1 (Toyo Kohan Co., Ltd.) 9 December 1999] and document 2 [WO, 99/41362, A1 (Toyo Kohan Co., Ltd.) 19 August 1999] cited in the international search report describe methods for constructing a cDNA library and a gDNA library, and therefore the inventions set forth in Claims 1, 3, and 4, and in Claims 7 and 8, which cite those Claims, do not appear to be novel.

Document 3 (Schena M. et al, "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 1996, pp. 10614-10619) cited in the international search report describes a microarray in which a cDNA library is affixed by a single strand, and therefore the invention set forth in Claim 8 does not appear to be novel.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12M1/00, C12Q1/68, G01N33/50, G01N27/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12M1/00, C12Q1/68, G01N33/50, G01N27/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-------------|--|-----------------------|
| X A | JP, 9-94086, A (Olympus Optical Co., Ltd.), 8 April, 1997 (08. 04. 97), Full text (Family: none) | 2-4, 8-13 1, 5-7 |
| X Y A | JP, 10-117764, A (Gijutsu Kenkyu Kumiai Iryo Fukushi Kiki Kenkyusho), 12 May, 1998 (12. 05. 98), Full text (Family: none) | 2-4 8-13 1, 5-7 |
| Y | JP, 7-107962, A (Hitachi, Ltd.), 25 April, 1995 (25. 04. 95), Full text (Family: none) | 8-13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 10 September, 1999 (10. 09. 99) | Date of mailing of the international search report 28 September, 1999 (28. 09. 99) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02994

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/00, C12M 1/00, C12Q 1/68, G01N33/50, G01N 27/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/00, C12M 1/00, C12Q 1/68, G01N33/50, G01N 27/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|-----------------------|
| X A | JP, 9-94086, A (オリンパス光学工業株式会社) 8. 4月. 1997 (08. 04. 97) 全文 ファミリーなし | 2-4, 8-13 1, 5-7 |
| X Y A | JP, 10-117764, A (技術研究組合医療福祉機器研究所) 12. 5月. 1998 (12. 05. 98) 全文 ファミリーなし | 2-4 8-13 1, 5-7 |
| Y | JP, 7-107962, A (株式会社日立製作所) 25. 4月. 1995 (25. 04. 95) 全文 ファミリーなし | 8-13 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 09. 99

国際調査報告の発送日

28. 09. 99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

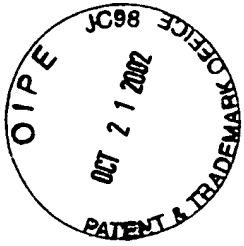
特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4 N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

太田 明男

④

殿

あて名

〒 151-0053
東京都渋谷区代々木2丁目23番1号
ニューステイト メナービル356号
太田特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
（PCT規則71.1）

発送日

（日.月.年）

17.04.01

出願人又は代理人
の書類記号

1676PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/03000

国際出願日

（日.月.年）

10.05.00

優先日

（日.月.年）

10.05.99

出願人（氏名又は名称）

東洋鋼板株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N

7823

電話番号

03-3581-1101 内線 3448

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

| | | |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 1676PCT | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/03000 | 国際出願日 （日.月.年） 10.05.00 | 優先日 （日.月.年） 10.05.99 |
| 国際特許分類（IPC） Int. Cl. C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34 | | |
| 出願人（氏名又は名称） 東洋鋼板株式会社 | | |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
（PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照）
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I ☒ 国際予備審査報告の基礎
II ☒ 優先権
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV ☐ 発明の単一性の欠如
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ☐ ある種の引用文献
VII ☐ 国際出願の不備
VIII ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|---|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受領した日 08.12.00 | 国際予備審査報告を作成した日 06.04.01 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁（IPEA/JF） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官（権限のある職員） 平田 和男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4N 7823 |

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

II. 優先権

- 1 ☐ この国際予備審査報告は、次の書類が所定の期間内に提出されなかったため、優先権の主張がされなかったものとして作成した。
- ☐ 優先権の主張の基礎となる先の出願の写し (PCT規則66.7(a))
- ☐ 優先権の主張の基礎となる先の出願の翻訳文 (PCT規則66.7(b))
- 2 ☒ この国際予備審査報告は、優先権の主張が無効であると認められるので、優先権の主張がされなかったものとして作成した。(PCT規則64.1)

したがって、この国際予備審査報告書においては、上記国際出願日を基準日とする

- 3 ☒ 追加の意見 (必要ならば)

請求の範囲1, 3, 4及び該項を引用する請求の範囲7並びに請求の範囲8に記載される発明は、特願平10-42971号として日本国に出願された特許出願の明細書及び図面に記載されているので、本国際出願において優先権主張の基となっている特願平11-127943号は、パリ条約第4条C(2)でいう最初の出願ではなく、請求の範囲1, 3, 4及び該項を引用する請求の範囲7並びに請求の範囲8に記載される発明に関しては優先権の主張は無効と認められ、上記国際出願日を基準日とする。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

| | | |
|-------|---------------|---|
| 請求の範囲 | 2, 5, 6 | 有 |
| 請求の範囲 | 1, 3, 4, 7, 8 | 無 |

進歩性 (IS)

| | | |
|-------|---------------|---|
| 請求の範囲 | 2, 5, 6 | 有 |
| 請求の範囲 | 1, 3, 4, 7, 8 | 無 |

産業上の利用可能性 (IA)

| | | |
|-------|-----|---|
| 請求の範囲 | 1-8 | 有 |
| 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1, 3, 4及び該項を引用する請求の範囲7並びに請求の範囲8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1 (WO, 99/63072, A1(東洋鋼板株式会社)1999.09.12) 及び文献2 (WO, 99/41362, A1(東洋鋼板株式会社)1999.08.19) に、cDNAライブラリー、gDNAライブラリーの製造法が記載され新規性がない。
請求の範囲8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献3 (Schena M. et al "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) Vol. 93, p. 10614-10619) に、cDNAライブラリーを1本鎖で固定したマイクロアレーが記載され新規性がない。



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 20 APR 2001

WIPO

PCT

| | | | |
|--|----------------|---|----------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 | 1676PCT | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 | PCT/JPO0/03000 | 国際出願日 (日.月.年) | 10.05.00 |
| | | 優先日 (日.月.年) | 10.05.99 |
| 国際特許分類(IPC) Int. Cl. C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/34 | | | |
| 出願人(氏名又は名称) 東洋鋼板株式会社 | | | |

| |
|---|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。 |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。 |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input checked="" type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

| | | |
|---|------------------------------|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 08.12.00 | 国際予備審査報告を作成した日 06.04.01 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 平田 和男 | 4N 7823 |
| 電話番号 03-3581-1101 | | 内線 3448 |

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|--------------------------|------------|---------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| | 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



II. 優先権

- 1 ☐ この国際予備審査報告は、次の書類が所定の期間内に提出されなかったため、優先権の主張がされなかったものとして作成した。
- ☐ 優先権の主張の基礎となる先の出願の写し (PCT規則66.7(a))
- ☐ 優先権の主張の基礎となる先の出願の翻訳文 (PCT規則66.7(b))
- 2 ☒ この国際予備審査報告は、優先権の主張が無効であると認められるので、優先権の主張がされなかったものとして作成した。(PCT規則64.1)

したがって、この国際予備審査報告書においては、上記国際出願日を基準日とする

- 3 ☒ 追加の意見 (必要ならば)

請求の範囲 1, 3, 4 及び該項を引用する請求の範囲 7 並びに請求の範囲 8 に記載される発明は、特願平 10-42971 号として日本国に出願された特許出願の明細書及び図面に記載されているので、本国際出願において優先権主張の基となっている特願平 11-127943 号は、パリ条約第 4 条 C (2) でいう最初の出願ではなく、請求の範囲 1, 3, 4 及び該項を引用する請求の範囲 7 並びに請求の範囲 8 に記載される発明に関しては優先権の主張は無効と認められ、上記国際出願日を基準日とする。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|---------------|-------|---------------|---|
| 新規性(N) | 請求の範囲 | 2, 5, 6 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1, 3, 4, 7, 8 | 無 |
| 進歩性(IS) | 請求の範囲 | 2, 5, 6 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1, 3, 4, 7, 8 | 無 |
| 産業上の利用可能性(IA) | 請求の範囲 | 1-8 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1, 3, 4及び該項を引用する請求の範囲7並びに請求の範囲8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1(WO, 99/63072, A1(東洋鋼板株式会社)1999.09.12)及び文献2(WO, 99/41362, A1(東洋鋼板株式会社)1999.08.19)に、cDNAライブラリー、gDNAライブラリーの製造法が記載され新規性がない。

請求の範囲8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献3(Schena M. et al "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) Vol. 93, p. 10614-10619)に、cDNAライブラリーを1本鎖で固定したマイクロアレーが記載され新規性がない。

